

РАЗДЕЛ I. ДИСФУНКЦИЯ ЭНДОТЕЛИЯ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ: ОБЩИЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ

ВЛИЯНИЕ ОКСИДА АЗОТА НА Ca^{2+} -ТРАНСПОРТНУЮ ФУНКЦИЮ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА СЕРДЦА КРЫСЫ

Гарматина О.Ю., Азаров В.И., Мойбенко А.А.

Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, г. Киев

Введение

Несмотря на то, что влияние оксида азота (NO) на внутриклеточную концентрацию кальция изучается уже давно, этот вопрос окончательно не выяснен. Показано, что выброс кальция через рианодинчувствительные кальциевые каналы (РКК) может увеличиваться под действием газообразного NO и нитрозотиолов. Также известно, что высокие дозы NO могут уменьшать активность РКК [1]. Что касается влияния NO на активный транспорт Ca^{2+} саркоплазматическим ретикуломом (СР), то полученные на различных объектах данные свидетельствуют как о возможности активации Ca^{2+} -насоса СР, так и его ингибирования [2]. Поэтому целью настоящей работы было выяснение характера и механизмов влияния NO на транспорт Ca^{2+} СР.

В нашем исследовании в качестве донора NO мы использовали 3-морфолиносиднонимин (SIN-1). Показано, что при неэнзиматическом распаде SIN-1 (около 100 мкМ) (при pH 7,4, при температуре 37°C) в буферном растворе образуется около 1 мкМ NO в минуту [3].

Материалы и методы исследования

Крыс массой 250-300 г анестезировали уретаном (125 мг на 100 г веса животного). Сердца быстро извлекали и помещали в холодный физиологический раствор, гомогенизировали в десятикратном объеме среды, содержащей 10 мМ трис-HCl, pH 7,4, с помощью гомогенизатора Поттера (тефлон - стекло) при 1000 об/мин 20 проходами пестика.

Скорость транспорта Ca^{2+} в присутствии оксалата измеряли Ca^{2+} -селективным электродом фирмы «Orion» (США) в термостатируемой при 37°C камере при постоянном перемешивании в среде инкубации, содержащей (в мМ): KCl 100, $MgCl_2$ 6, NaN_3 10, оксалата калия 10, АТФ 2. Измерение скорости транспорта Ca^{2+} выполняли в присутствии и в отсутствие рутениевого красного (РК) (25 мкМ), закрывающего

РКК. Реакцию запускали добавлением АТФ. Скорость транспорта Ca^{2+} везикулами СР выражали в $\mu\text{M Ca}^{2+}$ в минуту на грамм ткани сердца.

Ранее показано [3], что до начала распада SIN-1 существует лаг - фаза, равная 5-7 мин. Поэтому перед запуском транспорта Ca^{2+} с помощью АТФ гомогенат в среде инкубации прединкубировали с SIN-1 (30 μM) в течение 5 мин. При распаде SIN-1, одновременно с образованием NO, образуется эквимольное количество супероксиданиона ($\text{O}_2^{\bullet-}$) с дальнейшим образованием пероксинитрита (ONOO^-) [3]. Для разделения их действия использовались соответствующие блокаторы. Полученные результаты обрабатывались статистически с использованием критерия t Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

В СР поглощение Ca^{2+} осуществляется Ca^{2+} -АТФазой, в то время как выход Ca^{2+} из СР происходит, в основном, через РКК. Блокирование РКК РК (25 μM) позволяет регистрировать только вход Ca^{2+} в везикулы и выявить истинную (насколько это возможно в условиях настоящего эксперимента) активность Ca^{2+} -АТФазы. В наших экспериментах РК вызывал увеличение скорости транспорта на 110% (табл. 1).

Таблица 1

Влияние продуктов распада SIN-1 на скорость транспорта Ca^{2+} СР сердца крысы, $\mu\text{M Ca}^{2+}$ /мин. на 1 г ткани сердца

Серия	без РК	с РК
контроль	5.2 ± 0.5	10.9 ± 0.9
SIN-1	$0.7 \pm 0.06^*$	9.4 ± 0.7
SIN-1+L-метионин	$0.6 \pm 0.05^*$	—
SIN-1+СОД	$1.7 \pm 0.2^*$	—

Примечание: * $P < 0.05$ vs контроль ($n=6$)

В первые минуты после добавления SIN-1 (30 μM) в среду инкубации с гомогенатом можно судить о действии самого препарата на процесс транспорта Ca^{2+} . В наших экспериментах SIN-1 без прединкубации с гомогенатом не оказывал влияния на скорость поглощения Ca^{2+} СР. В то же время после прединкубации в течение 5 мин (конец лаг-фазы) происходило снижение скорости поглощения Ca^{2+} (Табл.1). Этот эффект исчезал после блокады РКК РК (25 μM) - скорость поглощения Ca^{2+} СР достоверно не отличалась от контрольных экспериментов с РК (Табл.1). На основании этого можно сделать вывод, что продукты распада SIN-1 не оказывают существенного влияния на активность Ca^{2+} -АТФазы СР, но значительно изменяют скорость выхода Ca^{2+} из везикул СР через РКК, увеличивая ее почти в 3 раза.

В наших экспериментах добавление в среду инкубации L-метионина 20 мМ (скавенджера ONOO-) одновременно с SIN-1 приводило к еще большему снижению скорости поглощения Ca^{2+} СР (Табл. 1). Эти данные дают основание предполагать, что ONOO- не играет большой роли в снижении скорости транспорта Ca^{2+} в везикулы СР и, по-видимому, основная роль принадлежит NO и/или $\text{O}_2^{\bullet-}$.

С целью разделения эффектов NO и $\text{O}_2^{\bullet-}$ на транспорт Ca^{2+} в СР использовался скавенджер $\text{O}_2^{\bullet-}$ - СОД (100 ед.). СОД существенным образом не изменяла характер реакции на SIN-1. Скорость транспорта Ca^{2+} СР уменьшалась, как и в опытах без СОД (Табл. 1). Однако достоверная разница двух серий опытов (только SIN-1 и SIN-1 + СОД) дает основание полагать, что $\text{O}_2^{\bullet-}$ также может принимать участие в действии на транспорт Ca^{2+} СР, однако его вклад на процессы транспорта относительно невелик.

Полученные нами данные согласуются с результатами исследований, которые показали, что в микромолярных концентрациях NO не оказывает влияния на активность Ca^{2+} -АТФазы [4] и, вместе с тем, оказывает стимулирующее действие на РКК. Ранее было показано [5; 6], что $\text{O}_2^{\bullet-}$ не оказывает влияния на активность Ca^{2+} -АТФазы и может воздействовать на рианодинновые рецепторы СР, в результате чего индуцируется выход Ca^{2+} из СР через РКК, что согласуется с полученными нами данными.

Таким образом, делая выводы из полученных данных, можно говорить об активирующем действии эквимолярных концентраций NO и $\text{O}_2^{\bullet-}$ на РКК СР сердца крысы с преобладающим влиянием NO.

Литература

1. Zahradnikova A., Minarovic I., Venema R.C., Meszaros L.G. Inactivation of the cardiac ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide // Cell Calcium.- 1997.- 22, №6.- P. 447-454.
2. Ishii T., Sunai O., Saitoh N., Nishio H., Takuchi T., Hata F. Inhibition of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase by nitric oxide // FEBS Lett.- 1998.- 440, № 1-2.-P. 218-222.
3. Kelm M., Dahmann R., Wink D., Feelisch M. The nitric oxide / superoxide assay // The Journ. Of Biolog. Chem.- 1997.- 272, № 15.- P. 9922-9932.
4. Stoyanovsky D., Murphy T., Anno P.R., Kim Y.M., Salama G. Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors // Cell Calcium.- 1997.- 21, № 1.- P. 19-29.
5. Kawakami M., Okabe E. Superoxide anion radical-triggered Ca^{2+} release from cardiac sarcoplasmic reticulum through ryanodine receptor Ca^{2+} channel // Mol. Pharmacol. - 1998. - 53, № 3. P. 497-503.

6. Okabe E. Superoxide anion radical selectively increases Ca^{2+} release from cardiac sarcoplasmic reticulum through ryanodine receptor Ca^{2+} channel // Nippon Yakurigaku Zasshi. - 1998. - 112, Suppl. 1. - P. 58P - 62P.

УЧАСТИЕ L-АРГИНИН-NO СИСТЕМЫ В МОДИФИКАЦИИ КИСЛОРОДСВЯЗУЮЩИХ СВОЙСТВ ГЕМОГЛОБИНА

Зинчук В.В.

Государственный медицинский университет, г. Гродно

В настоящее время активно исследуются различные аспекты биологического действия оксида азота (NO). Его образование происходит из аминокислоты L-аргинина под контролем фермента NO-синтазы в присутствии ряда кофакторов, образующих в совокупности L-аргинин-NO систему. Существует цикл связывания O_2 и NO в легких и их высвобождения на периферии, который можно рассматривать как систему "трех газов" ($\text{NO}/\text{O}_2/\text{CO}_2$) [Gross S.S., Lane P., 1999]. Представляет интерес изучение взаимодействия гемоглобина с оксидом азота. Взаимодействие NO с гемоглобином в эритроцитах важно для регуляции обоих этих молекул *in vivo*. Существующие свойства эритроцитов не ограничивают взаимодействие гемоглобина с NO в физиологических условиях, не только не разрушая его биоактивность, но и сохраняя ее. Мембрана эритроцитов рассматривается как некий специализированный насос для NO.

В артериальной крови NO в реакции с оксигемоглобином образует нитрат и метгемоглобин, а в венозной - нитрозилгемоглобин ($\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$), способный при высоких pO_2 дезинтегрироваться с участием молекулярного кислорода до гемоглобина и NO_3^- . Гемоглобин взаимодействует с NO через высокоаффинные Fe^{2+} -связывающие участки на геме (его сродство к NO в 8000 раз выше, чем к O_2). Спектр ЭПР $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ в растворе является суперпозицией спектров Т- и R-конформеров гемоглобина с преимущественным образованием Т-формы, которые обусловлены обратимыми переходами от сильного (R) до слабого (Т) взаимодействия Fe^{2+} -гем с проксимальным гистидином. Облучение мышей в малых дозах приводит к перераспределению соотношения между Т- и R-конформерами $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ в крови в сторону образования R-формы, что может иметь значение для изменения сродства гемоглобина к кислороду (СГК) [Миль Е.М. и др., 2000]. Образование нитрозилированного гемоглобина, судя по ЭПР-спектру, может быть